

糖尿病白ネズミのインシュリン応答性について(第2報)*

片山(須川) 洋子・伊東ソヨ子**・中村愛子

Effect of Daily Administration of Insulin on Liver Enzyme Activities in Alloxan Diabetic Rats (part 2)

YOHKO SUGAWA-KATAYAMA, SOYOKO ITOH AND AIKO NAKAMURA

はじめに

さきに著者らはアロキサン糖尿病白ネズミにインシュリンを比較的長期間にわたり連続投与した場合の血糖値および血中インシュリン濃度について報告した¹⁾。

飼料摂取量はインシュリンを連続投与したものとの間で差がみられなかったにもかかわらず、糖尿病白ネズミの体重増加がインシュリンを連続投与したものの方が有意に大きかったのは、一つには生体内における種々の代謝系がインシュリン投与によって変動を受けて栄養素の利用が高められたためであろう。

白ネズミに投与されたインシュリンは、注射後1~1.5時間ぐらいは血中インシュリン濃度を高く保つように影響する^{2,3)}ことから、おそらく注射直後には解糖系の鍵酵素に対しては促進的に、糖新生系の鍵酵素に対しては抑制的に作用するものと考えられる。しかしインシュリン注射2時間後にも同様の代謝変動がみられるのか、あるいはまた生体内でさらに複雑な調節が行なわれているのかどうかについてはあまりわかっていない。

Novello ら⁴⁾はアロキサン糖尿病白ネズミにインシュリンを3日間投与すると肝臓の hexokinase, glucokinase およびペントース燐酸回路の諸酵素は活性の上昇がみられるが、7日間インシュリンを投与しつづけると、それらの酵素活性は対照の値にまで低下すると報告している。

本研究ではアロキサン糖尿病白ネズミにインシュリンを比較的長期間にわたり投与しつづけた場合の肝酵素活性の変動を経時的に観察した。すなわちインシュリン投与を実験当日の前々日で中止し、その後20時間の絶食状態においた白ネズミについてインシュリンそのものの作用や摂取直後にみられる影響を除外した条件下で、肝臓の hexokinase (HK), glucose-6-phosphate dehydrogen-

ase (G6PDH), serine dehydratase (SDH), glucose-6-phosphatase (G6Pase) 活性を測定した。

実験方法

1) 供試動物および飼料組成

7週令の Sprague-Dawley 系の雄白ネズミを1匹ずつケージに入れ、固型飼料(日本クレア K K, CE-2)で予備飼育したのち、表-1に示す実験群に分けた。予備飼育後、白ネズミを20時間の絶食状態におき、アロキサン(15mg/100g 体重)を腹腔内に注射してアロキサン糖尿病にした。その1週間後から体重100g 当たり1国際単位のインシュリン(プロタミン亜鉛イソジン "シミズ" 清水製薬製)を1, 3, 5週間毎日腹腔内に注射した。インシュリンを注射しない対照群にはインシュリンと等容量の生理的食塩水を注射した。実験期間中は表-2に示す食餌を自由に摂取させ、毎日定時に体重および飼料の摂取量を測定した。飼育室内を温度23℃±

表-1 Experimental design

Rats	Group	Insulin administration	Determines
Alloxan Diabetes	A	week 0 —	7
	B	1 + —	7 7
	C	3 + —	7 7
	D	5 + —	6 7
Normal	E	5 —	7

* 栄養と食糧 26, 185 (1973) を第1報とする。

** 旧姓: 前川, 大阪女子短期大学

表-2 Composition of diet (%)

Casein	20.0
Corn oil	5.0
Salt-mixture	5.0
Choline-Cl	0.2
Vitamin-mixture	0.5
Corn starch	65.3
Cellulose	4.0
Vitamin A and D	15 drops/1000g in diet

1. 湿度60%に保ち、照明は午前8時から午後8時までとした。

2) 肝臓および腎臓の採取

インシュリン投与最終日の翌日、午後2時に飼料をとりのぞき、白ネズミを20時間の絶食状態においたのちペントバルビタールで麻酔して開腹し、腹部大動脈より採血後、肝臓、腎臓をすばやくとり出して精秤した。

3) 酵素液の分離と肝酵素活性の測定

秤量した肝臓を0.1Mトリス緩衝液(pH 8.0)を用いて20%ホモジェネートを作製し、このホモジェネート液を3,000 r.p.m. で5分間遠心分離した。その上清を6,600×gで20分間遠心分離し、更にその上清を105,000×gで60分間遠心分離した。こうして得られた上清をSephadex G-25のカラムを通した後、hexokinase (HK), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), およびserine dehydratase (SDH) 活性測定の酵素源とした。一方、105,000×gで沈殿したいわゆるミクロソーム画分は0.1Mトリス緩衝液で2回洗浄し、glucose-6-phosphatase (G6Pase) 活性測定の酵素源とした。これら諸酵素の活性は次の方法で測定した。

HK: 基質(glucose)にATP および酵素液を加え、生成したglucose-6-phosphateにNADP およびG6PDH (0.2mg/ml) を添加し、1分間に生成したNADPH量を波長340 nmにおける吸光値の増加で測定した。

G6PDH: 基質(glucose-6-phosphate)に酵素液およびNADPを加え、生成されたNADPH量を波長340 nmにおける吸光値の増加で測定した。

SDH: 基質(serine)に酵素液を加え、生成されたピルビン酸の量を波長515 nmで比色定量した。

いずれの酵素についても比活性は酵素液のたんぱく質1mgが1分間に生成したNADPH またはピルビン酸のnmolsで表わした。

G6Pase: 基質(glucose-6-phosphate)に酵素源を加え

生成された無機燐をFiske-Suffarow 法⁵⁾によって波長750 nmで比色定量した。なお本酵素の比活性は酵素液のたんぱく質1mgが1分間に生成した無機燐のμgで表わした。

実験結果および考察

1) 体重の増加

前報¹⁾において、インシュリンの連続投与がアロキサン糖尿病白ネズミの体重増加に対して明らかに好い効果をもたらすことを報告したが、今回の実験でもインシュリンの連続投与1週間の場合、白ネズミの体重増加はインシュリン群8.0 g/day, 対照群4.3 g/dayであった。インシュリン連続投与3週間後ではインシュリン群5.2 g/day, 対照群3.6 g/dayであった。インシュリン連続投与5週間の場合にはインシュリン群4.4 g/day, 対照群2.4 g/dayのようにいずれの投与期間でもインシュリンの効果が顕著にあらわれた。

2) 肝臓および腎臓の重量

肝臓および腎臓の重量におよぼすインシュリン投与の影響をしらべたところ、いずれもインシュリン投与のものの方が肝臓、腎臓ともに大きい傾向にあったが、しかしインシュリンを投与しない対照群との間に有意差は認められなかった。これを体重100 g当たりの値でくらべてみると一般に体重が小さいものほど大きく、体重が大きいものほど小さくなっていった(表-3)。

3) インシュリン連続投与がアロキサン糖尿病白ネズミの肝酵素活性におよぼす影響

各群における肝酵素活性の変動を表-4に示した。

HK: 正常白ネズミの値(9.48±1.44 units/mg protein)に対して、アロキサン糖尿病白ネズミはほとんどの群で約1/2に活性が低下した。本酵素の活性はインシュリンを1, 3, 5週間と連続投与しても何ら回復することなく、本実験の条件下においてはインシュリン投与の影響はみられなかった。

G6PDH: アロキサンの注射1週間後(A)は、正常群(E)に比べて活性が約1/2に低下した。さらに1週間後(B)では活性はむしろ上昇したが、この場合インシュリン投与の影響は認められなかった。一方、3週間(C), および5週間(D)後には本酵素の活性はB群に比べ低下した。インシュリンの連続投与による影響が観察されたのはD群のみであったが、やはり正常群(E)の活性よりも低い値であった。アロキサンの注射によって減少した本酵素の活性が、インシュリンの投与によって回復するとの報告⁶⁾⁷⁾⁸⁾は多いが、それらはほとんど短期間のインシュリン投与によるものである。しかし著者らの実

験条件においては、インシュリンの連続投与により内因性のインシュリン分泌がむしろ抑制されたためであろうか、1、3週間のインシュリン投与では対照群との間に差がみられなかった。さらにインシュリン投与を続けた場合（5週間）には対照群とくらべて有意に高くなり、本酵素はインシュリン投与期間によってさまざまな活性変動を示した。

SDH: 糖尿病のように糖新生系が亢進している状態においては、本酵素活性が上昇することはよく知られている。⁹⁾¹⁰⁾ 著者らの実験においてもアロキサン糖尿病白ネズミ肝のSDH活性は正常白ネズミの値にくらべて有意に高い活性を示した。いずれの群においてもインシュリンの連続投与によって対照よりも低い傾向を示したものは特徴的であり、そのなかでもB群およびC群ではインシュリン投与により有意に ($P < 0.02$, $P < 0.05$) 活性

が低下した。

アロキサン糖尿病においては、serine が盛んに動員されSDH活性は上昇するとされている。今回の実験のようにインシュリンの投与を実験当日の前々日で中止し、その後20時間の絶食状態というインシュリンそのものの影響はもはや考えられない時点においても、本酵素活性は低下していた。これは同時に測定した他の酵素とは異なった応答であった。

G6Pase: アロキサンの注射によってG6Pase活性は著しく上昇し、インシュリンを連続投与しても、しなくても活性はほとんど影響されていなかった。ここで注目されることはアロキサンの注射後、日数が経つにしたがって徐々に正常白ネズミの値に近づいていく傾向すらみられたことであった。

表-3 Weight of Liver and Kidney

Rats	Group	Insulin administration		Final weight (g)	Liver weight		Kidney weight	
					(g)	g/body weight 100g	(g)	g/body weight 100g
Alloxan Diabetes	A	0	-	146 ± 9.2 a	5.35 ± 0.47 a	3.46 ± 0.22 a	1.89 ± 0.24 a	1.36 ± 0.19 a
	B	1	+	230 ± 16.8 b	7.32 ± 0.54 a	3.16 ± 0.07 a	1.86 ± 0.11 a	0.81 ± 0.20 a
			-	178 ± 14.3 c	5.90 ± 0.42 a	3.37 ± 0.25 a	1.82 ± 0.12 a	1.07 ± 0.15 a
	C	3	+	250 ± 27.1 b	9.18 ± 0.27 a	3.90 ± 0.42 a	2.52 ± 0.41 b	1.10 ± 0.31 a
			-	220 ± 34.5 b	7.41 ± 0.90 a	3.49 ± 0.17 a	2.18 ± 0.15 b	1.05 ± 0.16 a
	D	5	+	310 ± 23.8 d	9.07 ± 0.64 a	3.10 ± 0.42 a	2.55 ± 0.11 b	0.90 ± 0.16 a
			-	261 ± 43.9 b	8.41 ± 0.87 a	3.73 ± 0.32 a	2.60 ± 0.13 b	1.13 ± 0.18 a
	Normal	E	5	430 ± 21.4 e	11.60 ± 1.21 b	2.67 ± 0.15 b	2.64 ± 0.22 b	0.61 ± 0.02 b

The values are mean ± SEM. Means not followed by the same superscript letter are significantly different, $p < 0.05$.

表-4 Effect of insulin administration

Rats	Group	Insulin administration		Hexokinase	Glucose-6-phosphate-hydrogenase	Serine dehydratase	Glucose-6-phosphatase
		week					
Alloxan Diabetes	A	0	-	3.49 ± 1.60 a	14.2 ± 3.5 a	100.1 ± 41.6 a	16.6 ± 1.1 a
	B	1	+	3.24 ± 0.90 a	46.2 ± 3.4 b	65.6 ± 13.7 a	17.1 ± 1.0 a
			-	3.46 ± 0.81 a	43.3 ± 10.2 b	171.5 ± 22.4 b	16.6 ± 1.6 a
	C	3	+	2.96 ± 0.44 a	18.8 ± 3.5 c	114.1 ± 33.0 a	12.1 ± 1.1 b
			-	5.06 ± 1.36 a	27.0 ± 4.8 c	172.1 ± 31.8 b	8.6 ± 0.6 b
	D	5	+	2.98 ± 0.82 a	26.6 ± 4.4 c	77.1 ± 22.8 a	7.3 ± 0.7 b
			-	4.66 ± 1.26 a	14.0 ± 2.0 a	101.7 ± 45.4 a	8.0 ± 0.8 b
	Normal	E	5	6.48 ± 1.44 b	36.2 ± 5.7 b	38.3 ± 19.7 c	6.9 ± 0.5 b

The values are mean ± SEM. Each enzyme is expressed in specific activity (units/min/mg protein). Means not followed by the same superscript letter are significantly different, $p < 0.05$.

以上の結果から、インシュリンの連続投与によって影響を受けた肝臓中の酵素はG6PDH（5週間投与のみ）とSDHだけであった。HKおよびG6Paseはアロキサンの

注射後に低下（あるいは上昇）した活性が、インシュリンを連続投与した場合にもしない場合にも、週が経つにつれて正常白ネズミの値に戻るといった傾向がみられた。

インシュリンの投与を実験当日の前々日に中止し、さらに糖尿病白ネズミを20時間の絶食状態においた本実験の条件下では、時間が経つにしたがって次から次へと代謝調節の上である新しい段階に達していくのであろうと推察される。

要 約

アロキサン糖尿病白ネズミにトウモロコシ澱粉を糖質源として、インシュリンを1, 3, 5週間と連続投与し、体重増加、肝臓および腎臓の重量、肝酵素(hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, serine dehydratase, glucose-6-phosphatase)活性について経時的に観察した。

- 1) アロキサン糖尿病白ネズミの体重増加はインシュリン投与群が対照に比較して大きかった。
- 2) 肝臓および腎臓の重量もインシュリンを投与したものの方が対照に比較して大きい傾向を示した。
- 3) インシュリンの連続投与に対して肝酵素活性の応答がみられたのはG6PDHとSDHであった。

文 献

- 1) 片山(須川)洋子, 前川ソヨ子: 栄養と食糧 **26**, 185 (1973)
- 2) Samaan, N. A. and Craig, J. W.: Metabolism **18**, 460 (1969)
- 3) El-Khodary, A. z., Ball, M. F., Oweiss, I. M. and Canary, J. J.: Metabolism **21**, 641 (1972)
- 4) Novello, F., Gumaa, J. A. and McLean, P.: Biochem. J. **111**, 713 (1969)
- 5) Fiske, C. H. and Subbarow, P.: J. Biol. Chem. **66**, 375 (1935)
- 6) Freedland, R. A., Cunliffe, T. L. and Zinkl, J. G.: J. Biol. Chem., **241**, 5448 (1966)
- 7) Soling, H. D., Kaplan, J., Erbstone, M. and Pitot, H. C.: Adv. Enz. Regulation **7**, 171, (1969)
- 8) Rudack, D., Chisholm, E. M. and Holten, D.: J. Biol. Chem., **246**, 1249 (1971)
- 9) 中川八郎, 木村博司, 三浦捷一, 内藤純子, 佐久間真樹, 須田正己, 林 伸一, 田中武彦: 医化学シンポジウム **6**, 45 (1966)
- 10) Rowsell, E. V., Al-Tai, A. H. and Carnie, J. A.: Biochem. J., **134**, 349 (1973)

Summary

The effect of daily administration of insulin on changes in liver enzyme (hexokinase, glucose-6-phosphate dehydrogenase, serine dehydratase and glucose-6-phosphatase) activities were observed.

Only glucose-6-phosphate dehydrogenase or serine dehydratase activities changed in response to daily insulin administration.

The liver and kidney of alloxan diabetic rats administered insulin were heavier than those of rats not given insulin.